

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-178599

(43)Date of publication of application : 06.07.1999

(51)Int.Cl.

C12Q 1/34
C12Q 1/56
// C08B 37/00

(21)Application number : 09-366410

(71)Applicant : WAKO PURE CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 22.12.1997

(72)Inventor : KATSUMI YOICHI

(54) REAGENT FOR MEASURING ENDOTOXIN AND/OR PEPTIDE GLUCAN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a reagent for measuring an endotoxin for the diagnoses of gram-negative bacterium-infected diseases and measuring a peptide glucan for the safety tests of medicines, etc., and the microorganism tests of foods, etc., by including β -1,3-glucanase.

SOLUTION: This reagent for measuring an endotoxin and/or a peptide glucan comprises β -1,3-glucanase, and a composition containing the inactivated factors of a body fluid-coagulating system cascade originating from an arthropod or a phenol oxidase precursor cascade and a substance reacting with the β -1,3- glucanase to activate the cascade. The reagent is useful for measuring the endotoxin to early diagnose septicemia infected with gram-negative bacteria, for measuring the peptide glucan existing in the cell walls of almost all procaryotes to test the safety of medicines, etc., test the presence of microorganisms in water, foods, etc., and diagnose infectious diseases, etc. The endotoxins are lipopolysaccharides existing in the outer cell wall membranes of gram-negative bacteria.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-178599

(43) 公開日 平成11年(1999) 7月6日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	F I
C 1 2 Q 1/34		C 1 2 Q 1/34
1/56		1/56
// C 0 8 B 37/00		C 0 8 B 37/00 G

審査請求 未請求 請求項の数16 F D (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平9-366410

(22) 出願日 平成9年(1997)12月22日

(71) 出願人 000252300

和光純薬工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

(72) 発明者 勝見 洋一

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(54) 【発明の名称】 エンドトキシン又は／及びペプチドグリカン測定用試薬

(57) 【要約】

【課題】 新規なエンドトキシン (E T) 又は／及びペプチドグリカン (P G) 測定用試薬の処理剤、これを用いた処理方法、及びE T又は／及びP G測定用試薬、並びにP Gの測定方法の提供。

【解決手段】 β -1, 3-グルカナーゼを含んでなる、E T又は／及びP G測定用試薬の処理剤、これを用いた処理方法、及び β -1, 3-グルカナーゼを含んでなるE T又は／及びP G測定用試薬、並びに β -1, 3-グルカナーゼの存在下、昆虫体液由来のフェノール酸化酵素前駆体カスケードの不活性型因子並びに β G R Pを含む組成物を含有するP G測定用試薬と試料とを反応させることを特徴とするP Gの測定方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 β -1, 3-グルカナーゼを含んでなるエンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬。

【請求項2】 節足動物体液と、 β -1, 3-グルカナーゼを含んでなるエンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬。

【請求項3】 節足動物由来の、①体液凝固系カスケード若しくはフェノール酸化酵素前駆体カスケードの不活性型因子及び② β -1, 3-グルカンと反応して該カスケードを活性化する物質を含む組成物と、 β -1, 3-グルカナーゼとを含んでなるエンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬。

【請求項4】 カプトガニ血球由来の体液凝固系カスケードの不活性型因子並びにファクターGを含む組成物と、 β -1, 3-グルカナーゼとを含んでなるエンドトキシン測定用試薬。

【請求項5】 昆虫体液由来のフェノール酸化酵素前駆体カスケードの不活性型因子並びに β -グルカン認識蛋白を含む組成物と、 β -1, 3-グルカナーゼとを含んでなるペプチドグリカン測定用試薬。

【請求項6】 β -1, 3-グルカナーゼを含んでなる、エンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬の処理剤。

【請求項7】 エンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬が、節足動物体液を含有する該測定用試薬である請求項6に記載の処理剤。

【請求項8】 エンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬が、節足動物由来の、①体液凝固系カスケード若しくはフェノール酸化酵素前駆体カスケードの不活性型因子と② β -1, 3-グルカンと反応して該カスケードを活性化する物質、とを含んでなる組成物を含有する該測定用試薬である請求項6に記載の処理剤。

【請求項9】 エンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬が、カプトガニ血球成分由来の体液凝固系カスケードの不活性型因子並びにファクターGを含む組成物を含有するエンドトキシン測定用試薬である請求項6に記載の処理剤。

【請求項10】 エンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬が、昆虫体液由来のフェノール酸化酵素前駆体カスケードの不活性型因子並びに β -グルカン認識蛋白を含む組成物を含有するペプチドグリカン測定用試薬である請求項6に記載の処理剤。

【請求項11】 β -1, 3-グルカナーゼで処理することを特徴とする、エンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬の処理方法。

【請求項12】 エンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬が、節足動物体液を含有する該測定用試薬である請求項11に記載の処理方法。

【請求項13】 エンドトキシン又は/及びペプチドグ

リカン測定用試薬が、節足動物由来の、①体液凝固系カスケード若しくはフェノール酸化酵素前駆体カスケードの不活性型因子と② β -1, 3-グルカンと反応して該カスケードを活性化する物質、とを含む組成物を含有する該測定用試薬である請求項11に記載の処理方法。

【請求項14】 エンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬が、カプトガニ血球成分由来の体液凝固系カスケードの不活性型因子並びにファクターGを含む組成物を含有するエンドトキシン測定用試薬である請求項11に記載の処理方法。

【請求項15】 エンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬が、昆虫体液由来のフェノール酸化酵素前駆体カスケードの不活性型因子並びに β -グルカン認識蛋白を含む組成物を含有するペプチドグリカン測定用試薬である請求項11に記載の処理方法。

【請求項16】 β -1, 3-グルカナーゼの存在下、昆虫体液由来のフェノール酸化酵素前駆体カスケードの不活性型因子並びに β -グルカン認識蛋白を含む組成物を含有するペプチドグリカン測定用試薬と試料とを反応させることを特徴とするペプチドグリカンの測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬の処理剤及び処理方法、並びにエンドトキシン又は/及びペプチドグリカン測定用試薬及びペプチドグリカン測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】エンドトキシン（以下、ETと略記する。）は、グラム陰性菌の細胞壁外膜に存在するリポ多糖類であり、発熱性等の種々の生物活性を有している。そのため、医薬品や血液に直接接する医療用具がETで汚染された場合、ごく微量でも重篤な結果を招くことがあり、これらのET汚染量は厳密に管理されなければならない。米国や日本の薬局方にもET試験法が収載されている。また、グラム陰性菌感染による敗血症の早期診断、グラム陰性菌感染症の治療効果及び予後の判定のため、血中のETを定量する試みも行われている。

【0003】一方、ペプチドグリカン（以下、PGと略記する。）は、N-アセチルムラミン酸又はN-グリコリルムラミン酸とD-アミノ酸を含む糖タンパクであり、マクロファージ、Bリンパ球、Tリンパ球等の免疫応答細胞に対する種々の作用、血小板の破壊、繊維芽細胞の増殖促進、骨吸収の促進、補体の活性化、体液性免疫応答の増進又は抑制、細胞性免疫の増強、細胞内皮系の刺激、一過性の白血球減少並びにその後の白血球増加、インターフェロン誘導因子の作用増強、自然抵抗力の強化、自己免疫疾患の実験的誘導、発熱誘発、ETの毒性に対する感受性向上、睡眠の促進乃至抑制、類上皮肉芽腫形成、結核菌等で処理した部位での出血壊死性炎症の惹起、急性並びに慢性毒性等、種々の生物活性を有

している。また、PGはグラム陽性菌とグラム陰性菌の両方に存在し、ETもPGも持っていない古細菌を除くと、殆どの原核生物がPGをその細胞壁に持っており、哺乳動物等の真核生物の細胞成分中にはPGが存在しないことから、PGが存在するところには細菌が存在すると思われる。そのため、PGの測定は、これを細胞壁の構成成分としている細菌類、藍藻類等の微生物の微量検出に有用であり、医薬品等の安全性試験、水や食品等の微生物試験、感染症の診断等への応用が期待されている。

【0004】これらETやPGの測定法としては、節足動物体液由来の体液凝固系カスケード又はフェノール酸化酵素前駆体カスケード（以下、*proPO*と略記する。）の不活性型因子を含む試薬を用いる方法が挙げられる。例えばETの場合には、所謂リムステスト等のカプトガニ血球成分液（以下、AL溶液と略記する。）を用いる方法（Yin et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 261, 284-289 (1972)）等が、その簡便性、費用が安価な点等から利用されている。また、PGの場合には、昆虫体液由来の試薬を用いる方法（特公平7-114707号公報）等が、その簡便性等の点から注目されている。

【0005】しかしながら、この節足動物体液中には、 β -1, 3-グルカンと反応して該カスケードを活性化し、例えば、AL溶液中には、 β -1, 3-グルカン（以下、 β Gと略記する。）と反応して酵素を活性化し、ETと反応して酵素を活性化し、又はグル化反応を生じる物質、所謂ファクターGと、ETと反応して酵素を活性化し、又はグル化反応を生じる物質、所謂ファクターCとが共存し（Morita, T. et al., *FEBS Lett.* 129, 318-321 (1981)）、また、昆虫体液中には、 β Gと結合して $proPO$ カスケードを活性化し、所謂 β G認識蛋白（以下、 β GRPと略記する。）と、ペプチドグリカンと結合して $proPO$ カスケードを活性化し、所謂PG認識蛋白とが共存するため（Yoshida, H., Ochiai, M., and Ashida, M. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 1177-1184）、上記方法に於ては、用いられる試薬が、ETやPGのみならず β Gとも反応し、その特異性が損なわれるという問題があった。

【0006】このような問題点を解決するため種々の方法が報告されている（特開昭58-13516号公報、特開昭59-27828号公報、特公平7-114707号公報、特公平7-15474号公報、*Biochem. Biophys. Research Communication*, 101(2), 434-439(1981)等）が、これらの方法は、何れも節足動物体液から、アフィニティークロマトグラフィー法等により節足動物体液中に存在するファクターGや β GRPの除去を行う方法であるため、極めて煩雑な操作を要するという問題点や、得られた試薬の測定感度が著しく低下する場合があるという問題点を有していた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記した如き状況に鑑みなされたもので、新規なET又は/及びPG測定用試薬の処理剤、これを用いた処理方法、及びET又は/及びPGに特異的な測定用試薬並びにPGの測定方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため、本発明は下記の構成からなる。

【0009】(1) β -1, 3-グルカナーゼを含んでなるET又は/及びPG測定用試薬。

【0010】(2) 節足動物体液と、 β -1, 3-グルカナーゼを含んでなる、ET又は/及びPG測定用試薬。

【0011】(3) 節足動物由来の、①体液凝固系カスケード若しくは $proPO$ カスケードの不活性型因子及び② β -1, 3-グルカンと反応して該カスケードを活性化し、物質を含む組成物と、 β -1, 3-グルカナーゼとを含んでなるET又は/及びPG測定用試薬。

【0012】(4) カプトガニ血球由来の体液凝固系カスケードの不活性型因子並びにファクターGを含む組成物と、 β -1, 3-グルカナーゼとを含んでなるET測定用試薬。

【0013】(5) 昆虫体液由来の $proPO$ カスケードの不活性型因子並びに β GRPを含む組成物と、 β -1, 3-グルカナーゼとを含んでなるPG測定用試薬。

【0014】(6) β -1, 3-グルカナーゼを含んでなる、ET又は/及びPG測定用試薬の処理剤。

【0015】(7) ET又は/及びPG測定用試薬が、節足動物体液を含有する該測定用試薬である上記(6)に記載の処理剤。

【0016】(8) ET又は/及びPG測定用試薬が、節足動物由来の、①体液凝固系カスケード若しくは $proPO$ カスケードの不活性型因子と② β -1, 3-グルカンと反応して該カスケードを活性化し、物質、とを含んで組成物を含有する該測定用試薬である上記(6)に記載の処理剤。

【0017】(9) ET又は/及びPG測定用試薬が、カプトガニ血球成分由来の体液凝固系カスケードの不活性型因子並びにファクターGを含む組成物を含有するET測定用試薬である上記(8)に記載の処理剤。

【0018】(10) ET又は/及びPG測定用試薬が、昆虫体液由来の $proPO$ カスケードの不活性型因子並びに β GRPを含む組成物を含有するPG測定用試薬である上記(6)に記載の処理剤。

【0019】(11) β -1, 3-グルカナーゼで処理することを特徴とする、ET又は/及びPG測定用試薬の処理方法。

【0020】(12) ET又は/及びPG測定用試薬が、節足動物体液を含有する該測定用試薬である上記

(11)に記載の処理方法。

【0021】(13) ET又は/及びPG測定用試薬が、節足動物由来の、①体液凝固系カスケード若しくはproPOカスケードの不活性型因子と② β -1, 3-グルカンと反応して該カスケードを活性化する物質、とを含む組成物を含有する該測定用試薬である上記(11)に記載の処理方法。

【0022】(14) ET又は/及びPG測定用試薬が、カプトガニ血球成分由来の体液凝固系カスケードの不活性型因子並びにファクターGを含む組成物を含有するET測定用試薬である上記(11)に記載の処理方法。

【0023】(15) ET又は/及びPG測定用試薬が、昆虫体液由来のproPOカスケードの不活性型因子並びに β GRPを含む組成物を含有するPG測定用試薬である上記(11)に記載の処理方法。

【0024】(16) β -1, 3-グルカナーゼの存在下、昆虫体液由来のproPOカスケードの不活性型因子並びに β GRPを含む組成物を含有するPG測定用試薬と試料とを反応させることを特徴とするPGの測定方法。

【0025】即ち、本発明者等は、ET又は/及びPGに特異的な試薬を簡便に調製し得る方法を求めて鋭意研究を行った結果、 β -1, 3-グルカナーゼを、例えば自体公知の節足動物体液由来の、体液凝固系カスケード若しくはproPOカスケード(以下、本発明に係るカスケードと略記することがある。)の不活性型因子と β Gと反応して該カスケードを活性化する物質、とを含むET又は/及びPG測定用試薬等に共存させておけば、該試薬中に存在する β Gと反応して本発明に係るカスケードを活性化作用を有する物質の当該作用を抑制することができ、ET又は/及びPGを特異的に測定し得る試薬が簡便に得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0026】本発明に於いて用いられる β -1, 3-グルカナーゼとしては、 β -1, 3-グルカン加水分解してオリゴ糖又はグルコースを生成する作用を有するものであって、 β Gと反応して本発明に係るカスケードを活性化作用を有する物質の当該作用を抑制する性質を有するものであれば良く、特に限定されない。また、その由来についても特に限定されず、例えば、細菌、糸状菌、真菌等の微生物に由来するもの、例えば、大麦、大豆、稲等の植物に由来するもの、例えば、ウニ等の動物に由来するもの等が挙げられる。中でも、*Arthrobacter* sp., *Rhizoctonia* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.等に由来するものが好ましく挙げられる。また、これらのなかでも、至適温度を通常5~80°C、好ましくは20~40°C、至適pHを通常4~9、好ましくは6~8の範囲内に有し、安定pHが通常3~10、好ましくは4~9の範囲に存在するものであって、分子量が通常1~50万、好ましくは2~10万であるものが特に好ましい。

【0027】本発明に於いて用いられる β -1, 3-グ

ルカナーゼの使用濃度としては、ET又は/及びPG測定用試薬、例えば、節足動物体液由来の、体液凝固系カスケード又はproPOカスケードの不活性型因子を含むET又は/及びPG測定用試薬中に存在する、 β Gと反応して該カスケードを活性化作用を抑制し得る濃度であれば良く、特に限定されない。具体的には、使用する β -1, 3-グルカナーゼの種類により若干変動するが、ET又は/及びPG測定用試薬中の濃度としては、通常0.2~2000u/ml、好ましくは2~1000u/ml、より好ましくは10~500u/mlの範囲から適宜選択される。より具体的には、例えば、ET又は/及びPG測定用試薬中のファクターG量50 μ g/ml以下、好ましくは1 μ g/ml以下に対して、通常0.2~2000u/ml、好ましくは2~1000u/ml、より好ましくは10~500u/mlの範囲から適宜選択され、また、ET又は/及びPG測定用試薬中の β GRP量50 μ g/ml以下、好ましくは1 μ g/ml以下に対して、通常0.2~2000u/ml、好ましくは2~1000u/ml、より好ましくは10~500u/mlの範囲から適宜選択される。また、本発明に係る β -1, 3-グルカナーゼは、夫々単独で用いても良いし、二種以上適宜組み合わせ用いても良い。尚、ファクターG量の測定は、例えば以下の如き方法(Muta, T. et al., J. Biol. Chem. 270, 892-897 (1995))により行えばよい。即ち、試料0.01mlと、0.1M Tris-HCl緩衝液(0.5mg/ml牛血清アルブミン及び125ng/mlカードラン含有、pH8.0) 0.19mlとを混合し、37°Cで20分間反応させる。次いで、該反応液に、2 mM Boc-Glu(OBzl)-Gly-Arg-MCA (t-butyloxycarbonyl- γ -benzyl-L-glutamyl-glycyl-L-arginine-4-methyl-coumaryl-7-amide) 0.01mlを添加・混合し、37°Cで30分間反応させる。反応後、該反応液に、0.6M酢酸0.79mlを添加して反応を停止させる。次いで、この反応液中に存在する遊離AMC (7-amino-4-methyl-coumarin) 量を蛍光分光光度計により測定する。得られた測定値と、予め得られた既知濃度の精製ファクターGの測定値とを比較して、活性型ファクターGの活性値を算出し、試料中のファクターG量を求めることができる。また、 β GRP量の測定は、例えば以下の如き方法(Ochiai, M., Ashida, M. (1988) J. Biol. Chem. 263, 12056-12062)により行えばよい。即ち、遠心チューブ中に、試料1mlと0.3%カードランゲル0.2mlとを混合して、試料中に含まれる β GRPを、該カードランゲルに吸着させる。次いで、該遠心チューブを遠心分離処理して、カードランゲルを回収する。回収したカードランゲルを、蒸留水、1 M塩化ナトリウム水溶液、8 M尿素水溶液、蒸留水を夫々用いて順次洗浄した後、該カードランゲルに、蒸留水50 μ lとSDS-電気泳動可溶化バッファー(1%SDS、1% β -メルカプトエタノール、30%グリセロール及び0.01%ブロムフェノールブルー含有82mM Tris-HCl (pH8.8)) 20 μ lを添加混合し、100°Cで5分間加熱処

理を行う。再度遠心処理を行った後、上清の一部を取り出し、SDS-電気泳動（アクリルアミド濃度12%、還元条件下）を行う。泳動後、泳動ゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色し、 β GRPのバンドの染色強度をデンストメーターで測定する。精製した β GRPについても同様にSDS-電気泳動を行い、 β GRP量と染色強度についての検量線を作成する。該検量線を用いて、デンストメーターで測定した試料中の β GRPの染色強度から、試料中の β GRP量を求めることができる。

【0028】上記した如き β -1, 3-グルカナーゼを用いて自体公知のET又は/及びPG測定用試薬を処理すれば、当該ET又は/及びPG測定用試薬中に存在するファクターGや β GRP等の、 β Gと反応して本発明に係るカスケードを活性化する物質が β Gにより活性化されて該カスケードを活性化する作用を抑制することができ、ET又は/及びPGを特異的に測定し得る試薬を簡便に調製することが可能となる。

【0029】本発明に於いて用いられる自体公知のET又は/及びPG測定用試薬としては、ET又は/及びPGにより活性化される血液凝固系カスケード若しくはproPOカスケード（Muta, T., and Iwanaga, S., *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, **15**, 154-189 (1996); Ashida, M., and Yamazaki, H. I. *Molting and Metamorphosis*, 239-265, Japan Sci. Soc. Press (1990); Johansson, M. W., and Soderhall, K., *Parasitol. Today*, **5**, 171-176 (1989))の不活性型因子と、 β Gと反応して該カスケードを活性化する物質とを含有し、微生物細胞壁に存在するETやPGと反応する性質を有するものであれば特に限定されない。また、その由来についても特に限定されないが、例えば、昆虫、カブトガニ、甲殻類等の節足動物の体液を含んでなるもの等が好ましく挙げられる。昆虫としては、特に制限はないが、なるべく大型のもので飼育方法の確立しているものが望ましく、例えば、タバコスズメガ、カイコガ等の鱗翅類、センチクバエ、イエバエ等の双翅類、トノサマバッタ、エンマコオロギ等の直翅類、センノキカミキリ等の甲虫類等が挙げられ、なかでも例えば、*Bombyx mori*, *Bombyx mori mandarina*等のカイコ属に属するカイコガが特に好ましい。また、カブトガニとしては、特に制限はないが、例えば、リムルス (*Limulus*) 属、タキプレウス (*Tachyplesus*) 属、カルシノスコルピウス (*Carcinoscorpius*) 属等に属するカブトガニが挙げられる。甲虫類としては、例えば、*Astacus*属、*Cambarus*属、*Procambarus*属、*Cambaroides*属等のザリガニが好ましく挙げられる。尚、上記した如き節足動物の体液を含んでなるET又は/及びPG測定用試薬は、体液そのものを含んでなるもの、その血球成分を含んでなるもの、ヘモリンパ (hemolymph) 等を含んでなるもの、或いはこれらから精製されたETやPGと反応する因子やカス

ケードを含んでなるもの等が含まれる。

【0030】本発明に於いて用いられる自体公知のET又は/及びPG測定用試薬のうち、ETを測定する場合の試薬としては、上記した如きカブトガニの血球成分 (lysate) から得られるもので、体液凝固カスケード (Muta, T., and Iwanaga, S., *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, **15**, 154-189 (1996)) に関与する因子であって活性化が起こっていない状態のもの (不活性型因子) 並びに β Gと反応して該カスケードを活性化する作用を有する物質 (ファクターG) を含むものであって、ETや β Gとの反応により酵素 (プロテアーゼ等) の活性化やゲル化反応を生じる性質或いは濁度が増加する性質を有する試薬、所謂AL溶液が特に好ましく使用される。尚、AL溶液としては、これに更に β GやETと反応した結果活性化される酵素の基質であって該酵素の作用により適当な色素等 (蛍光性、発光性のものでも可) を生じる物質 (所謂合成基質を含む。) 等を添加したものも使用可能である。

【0031】また、本発明に於いて用いられる自体公知のET又は/及びPG測定用試薬のうち、PGを測定する場合の試薬としては、上記した如き昆虫の体液から得られるもので、proPOカスケード (Ashida and Yamazaki, *Molting and Metamorphosis*, 239-265, Japan Sci. Soc. Press (1990)) に関与する因子であって活性化が起こっていない状態のもの (不活性型因子) 並びに β Gと反応して該カスケードを活性化する物質 (β GRP) を含有し、微生物細胞壁に存在する β GやPGと反応してproPOを活性化し得る性質を有する試薬、所謂PPO試薬が特に好ましく使用される。尚、PPO試薬は、通常これに β GやPGと反応した結果活性化される酵素の基質であって該酵素の作用により適当な色素等 (蛍光性、発光性のものでも可) を生じる物質 (所謂合成基質を含む。) 等を添加して使用される。

【0032】上記した如きカブトガニから血球成分を得る方法としては、例えばカブトガニの頭胸部と腹部の間接より採血して得られた血液を、N-エチルマレイミドを含むNaCl中にしばらく静置した後、血球 (Amoebocyte) を回収し、該血球より血球成分を採取する方法 (J. Levin, F. B. Banq., *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **11**, 265-274 (1964)) 等が挙げられる。また、例えばACC社 (Associates of Cape Cod)、バイオウィタカー社 (Bio Whittaker bioproducts, Inc.)、チャールズリバー・エンドセーフ社 (Charles River-Endosafe, Inc.)、生化学工業 (株)、和光純薬工業 (株) 等から市販されているAL溶液の凍結乾燥品をもとに調製したものも同様に使用可能である。

【0033】上記した如き昆虫から体液を得る場合には、体液としては体腔から得られるヘモリンパ (hemolymph) が最も得られ易くより一般的であり、その採取方法としては、例えば、昆虫を氷上に置き動きを止めた

後、トウキビ因子(サトウキビに含まれるグルコース、アミノ酸などからなる高分子物質)を不純物として含むショ糖、又はトウキビ因子そのもの、或いは例えば(p-アミジノフェニル)メタンスルホニルフルオリド(p-APMSF)、フェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)、ジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)、p-ニトロフェニル-p'-グアニジノ安息香酸(NPGB)、ジヒドロキシクロロメチルクマリン(DCC)等のセリンプロテアーゼインヒビター等を含む生理食塩水を体腔に注射し、その後しばらく放置して、体腔よりヘモリンパを集める方法、上記した如きセリンプロテアーゼインヒビターを含む昆虫体液と等張な溶液にヘモリンパを添加して採取する方法(Ashida, M., *Insect Biochem.*, 11, 57-65, 1981, 特開平1-14266号公報)等が挙げられる。このようにして得られたヘモリンパは、遠心分離処理して血球を除き、その後透析すれば本発明に係るPPO試薬として使用可能な血漿が得られる。尚、このような試薬は市販されているもの(例えば、SLP™試薬セット、和光純薬工業(株)製)を使用しても良い。

【0034】本発明に係るβ-1, 3-グルカナーゼで自体公知のET又は/及びPG測定用試薬を処理する方法としては、当該ET又は/及びPG測定用試薬中にβ-1, 3-グルカナーゼを共存させる方法であればよく、特に限定されないが、最も一般的な方法としては、β-1, 3-グルカナーゼ自体を、当該ET又は/及びPG測定用試薬に直接添加・混合させたり、β-1, 3-グルカナーゼを適当な溶媒に含有させて溶液状態とし、これを当該ET又は/及びPG測定用試薬と混合させる等して、当該ET又は/及びPG測定用試薬にβ-1, 3-グルカナーゼを添加・混合させて共存させる方法等が挙げられる。

【0035】本発明に於いて、β-1, 3-グルカナーゼを含有させる溶媒としては、血液凝固系カスケード又はproPOカスケードを活性化せず、且つβ-1, 3-グルカナーゼが有する、βGと反応して該カスケードを活性化する物質の該活性化作用を抑制する性質を阻害しないものであれば、特に限定されず、例えば蒸留水、緩衝液等が挙げられる。緩衝液を構成する緩衝剤としては、通常この分野で用いられるものは全て使用可能であり、具体的には、例えばリン酸塩、ホウ酸塩、酢酸塩、トリス緩衝剤、グッドの緩衝剤等が挙げられ、その使用濃度は、通常この分野に於ける使用濃度範囲から適宜選択すればよい。

【0036】本発明のET又は/及びPG測定用試薬の処理剤は、上記した如きβ-1, 3-グルカナーゼを含んでなるものであり、構成要素の好ましい態様、具体例については上で述べた通りである。

【0037】本発明のβ-1, 3-グルカナーゼを含んでなるET又は/及びPG測定用試薬は、自体公知のE

T又は/及びPG測定用試薬、例えば、AL溶液、PPO試薬等の節足動物体液を含んでなるET又は/及びPG測定用試薬に、前述した如きβ-1, 3-グルカナーゼを前述した如き濃度範囲で共存させることにより容易に得ることができる。このようにして得られた本発明のET又は/及びPG測定用試薬を用い、自体公知の測定法により試薬中のET又は/及びPGの測定を行えば、共存するβGによる影響を受けることなくET又は/及びPGを特異的に測定することができる。

【0038】自体公知の測定法としては、前述した如き自体公知のET又は/及びPG測定用試薬を用いるものであればよく特に限定されない。例えばAL溶液を用いる測定法としては、例えば試料と、AL溶液とを混合した後、適当な温度で一定時間インキュベートし、凝固によるゲル生成の有無を調べるゲル化転倒法(Cooper, J. F. et al., *J. Lab. clin. Med.*, 78, 138-148(1971))、凝固に伴って生ずる濁度を測定する比濁法(Bondar, R. J. L. et al., *Biomedical Applications of the Horseshoe Crab* (ed. Cohan, E.), 435-451, Alan R. Liss, Inc. New York (1979))、凝固に伴って生ずる濁度が一定の値に達するまでの時間を測定する比濁時間分析法(Oishi, H. et al., *J. Parenter. Sci. Techn.*, 39, 194-200 (1985))、AL溶液の成分とETとの反応に伴って活性化される酵素(例えばプロテアーゼ等)の活性を合成基質を用いて測定する合成基質法(Nakamura, S. et al., *J. Biochem.*, 81, 1567-1569 (1977))等が好ましく挙げられる。

【0039】また、PPO試薬を用いる測定法としては、例えば試料と、PPO試薬とを混合・反応させ、一定時間後の反応液中の例えばN-α-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル分解酵素(BAEEase)、プロフェノールオキシダーゼ活性化酵素(PPAE)、フェノールオキシダーゼ(PO)等の酵素の活性を自体公知の測定法に従って測定し、予め濃度既知のPGの標準液を用いて同様の操作により作製した検量線からPGの量を算出する方法(M. Tsuchiya et al. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 15 (1996) 129-134, 特開平7-184690号公報等)、proPOが活性化されてPOとなる時間が試料中のPG濃度に依存する現象を利用して、PPO試薬と試料とを混合した後、POによる反応生成物の量がある一定値となるまでの時間を測定する方法(M. Tsuchiya et al. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 15 (1996) 129-134等)等が好ましく挙げられる。

【0040】これら自体公知の測定法に於いて用いられるその他の試薬類としては、例えば3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン(ドーパ)、合成基質等の測定する酵素の基質、共役酵素、補酵素等、要すれば、緩衝剤、発色剤、例えば2価の金属イオン(Ca²⁺, Mg²⁺等)等の賦活剤、安定化剤、界面活性剤等、目的とする酵素

活性の測定法として自体公知の方法に於いて使用される試薬類等が挙げられる。これら自体公知の測定法に於ける反応pHとしては、測定方法や測定する酵素の種類等によって異なるが、通常pH4~11、好ましくはpH8~9である。また、この反応pHを維持するため緩衝剤を使用しても良く、緩衝剤としては反応に影響を与えないものであれば、種類、使用濃度ともに特に制限されず、例えばリン酸塩、ホウ酸塩、酢酸塩、トリス緩衝剤、グッドの緩衝剤等が挙げられる。また、反応温度及び反応時間については、反応が進行する温度、時間であれば特に制限されず、反応温度としては、通常0~50℃、好ましくは4~30℃、反応時間としては、通常1秒~20時間、好ましくは10秒~2時間の範囲から適宜選択される。また、上記した如き自体公知の測定法のうち、PPO試薬を用いる場合には、0.001~1000mM、好ましくは5~100mMの範囲内の2価の金属イオン、例えばCa²⁺、Mg²⁺等が存在していることが望ましい。

【0041】本発明の試薬を用いてET又は/及びPGを測定し得る試料としては、試料中の微生物の有無を検出する必要があるものであれば特に限定されないが、例えば半導体用洗浄水、例えば血液、血漿、血清、髄液等の体液、尿、水道水、工場廃液、食品、飲料、医療器具等を洗浄した後の洗浄液等が挙げられる。

【0042】本発明の試薬を用いてET又は/及びPGを測定するには、例えば以下の如く行えばよい。即ち、例えばAL溶液を用いてETを測定する場合には、上記した如き試料と、本発明に係るβ-1, 3-グルカナーゼを含有するET測定用試薬とを混合し、一定の反応条件下で反応（例えば、0~50℃、好ましくは4~30℃）させ、トキシノメーター（和光純業工業（株）製）等を用いて該反応液のゲル化に伴って減少する透過光量比が、予め設定した閾値に達するまでのゲル化時間を測定する。予め既知濃度のETを含有する試料を用いて同様に行なって得られた、ET濃度とゲル化時間との関係を示す検量線から、試料中のET含有量を算出することができる。

【0043】また、例えばPPO試薬を用いてPGを測定する場合には、上記した如き試料と、本発明に係るβ-1, 3-グルカナーゼを含有するPG測定用試薬とを混合し、一定の反応条件下で反応（例えば、0~50℃、好ましくは4~30℃で、1秒~20時間、好ましくは10秒~2時間）させ、例えば市販のマイクロプレートリーダーThermo-Max（Molecular Devices社製）、トキシノメーター（和光純業工業（株）製）等を用いて該反応液の吸光度が予め設定した閾値に達するまでの反応時間を測定する。得られた反応時間の測定値と、予め既知濃度のPGを含有する試料を用いて同様に行なって得られた、PG濃度と反応時間との関係を示す検量線から、試料中のPG含有量を算出することができる。

【0044】本発明のPGの測定方法は、本発明に係る

β-1, 3-グルカナーゼを上記した如き濃度範囲で存在させる以外は、上記した如きPPO試薬を用いる自体公知の測定法に準じて、実施すれば良く、使用されるその他の試薬類も上記した如きこれら自体公知の測定法に準じて適宜選択すればよい。即ち、上記した如き試料を、β-1, 3-グルカナーゼの存在下、上記した如き自体公知のPPO試薬を用いる測定法に準じて測定することにより、試料中のPGを特異的に測定することができる。

10 【0045】また、本発明のPG測定方法に於いては、PPO試薬と試料とを反応させる際に、本発明に係るβ-1, 3-グルカナーゼが上記した如き濃度範囲で共存していればよく、共存させる方法については特に限定されない。具体的には、例えば上記した如きPPO試薬中に、本発明に係るβ-1, 3-グルカナーゼを含有させ、これと試料とを混合する方法、例えば上記した如き本発明に係るβ-1, 3-グルカナーゼを含有する緩衝液等の溶液で試料を希釈し、該希釈試料と上記した如きPPO試薬とを混合する方法等が挙げられる。

20 【0046】以下に参考例、実施例及び比較例をあげて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。尚、以下の実施例に於いて使用される蒸留水及び注射用水（大塚製薬（株）製）は、市販のSLP[®]試薬セット（和光純業工業（株）製）を用いて、βG、PG、又は/及びETが検出されないことを確認したものを使用した。

【0047】

【実施例】実施例1. β-1, 3-グルカナーゼを含有するPPO試薬と、βG及びPGとの反応性の検討

【試薬】

30 (1) PPO試薬; Ashida, M., (1981) Insect Biochem., 11, 57-65に記載の方法に準じて得られたカイコ体液の画分をPPO試薬とした(βGRP量: 1μg/ml以下)。尚、PPO試薬中のβGRP量は、Ochiai, M., Ashida, M. (1988) J. Biol. Chem. 263, 12056-12062の方法に準じて測定した。

(2) ドーバ・カルシウム溶液; 0.1M MOPS緩衝液(pH6.5)に、ドーバ 6mM及び塩化カルシウム 24mMの濃度になるように溶解した後、ゼータポア膜(キュノ社製)を使用して濾過したものをドーバ・カルシウム溶液とした。

(3) β-1, 3-グルカナーゼ溶液; ツニカーゼ R 70 (tunicase R 70、大和化成(株)製、至適温度: 35℃、至適pH: 7.0~8.0、安定pH: 4.0~9.0、分子量: 55,000)を0.1M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)に10mg/mlになるように溶解した後、ゼータポア膜を使用して濾過したものをβ-1, 3-グルカナーゼ溶液とした。

(4) PG標準液; ミクロコッカス ルテウス(Micrococcus luteus)の乾燥菌体1gを、シュレイファーらの方法(Schleifer, K. H., and Kandlar, O., Bacterio

1. Rev., 36, 407-477 (1972)) に準じて処理し、トリブシン処理細胞壁 (PG) 95mgを得た。得られたトリブシン処理細胞壁 (PG) 20mgを注射用水 (大塚製薬 (株) 製) 20mlに加え、超音波処理により分散させたものをPG原液とした。尚、使用にあたっては、該PG標準液を蒸留水で希釈して、1ng/mlから1μg/mlまでの希釈系列を調製してPG標準液とした。

(5) βG標準液: カードラン (和光純薬工業 (株) 製) 10mgを0.25N水酸化ナトリウム溶液10mlに溶解したものをβG原液とした。尚、使用にあたっては、該βG標準液を蒸留水で希釈して、10pg/mlから10μg/mlまでの希釈系列を調製してβG標準液とした。

【0048】〔測定機器〕マイクロプレートリーダーThermo-Max (Molecular Devices社製) を用い、下記条件で測定を行った。

温度: 30℃

時間: 1時間40分

オンセットOD: 0.01

測定波長: 650nm

尚、データの解析は、Soft Max version2.32を用いて行った。

*

【0049】〔操作〕予め250℃で2時間乾熱滅菌処理したガラス製試験管に、PPO試薬 575μl、ドーバ・カルシウム溶液 375μl、β-1, 3-グルカナーゼ溶液 175μlを分注・混合して反応試液とした。次いで、ポリスチレン製96穴マイクロプレートに、所定濃度のβG標準液又は所定濃度のPG標準液を夫々50μlずつ分注し、次いで、反応試液を50μlずつ分注し、マイクロプレートリーダーを用いて、上記の如き条件で測定を行った。また、コントロールとして、β-1, 3-グルカン溶液の代わりに、蒸留水175μlを用いて調製した反応試液 (β-1, 3-グルカナーゼ無添加) を使用して、上記と同様に測定を行った。

【0050】〔結果〕PG標準液を用いて得られたオンセットタイム (Onset Time: オンセットOD=0.01に達するまでの時間 (秒)) を表1に、また、βG標準液を用いて得られたオンセットタイム (Onset Time: オンセットOD=0.01に達するまでの時間 (秒)) を表2に夫々示す。

【0051】

【表1】

PG濃度 (ng/ml)	オンセットタイム (秒)	
	β-1,3-グルカナーゼ無添加	β-1,3-グルカナーゼ添加
0	nd	nd
1	3348	4248
10	2178	2880
100	1575	2142
1000	1359	1872

*表中のndは、測定時間内にオンセットODに達しなかったことを示す。

【0052】

【表2】

β G濃度 (ng/ml)	オンセットタイム(秒)	
	β -1,3-グルカナーゼ無添加	β -1,3-グルカナーゼ添加
0	nd	nd
0.01	5850	nd
0.1	3762	nd
1	2718	nd
10	1962	nd
100	1476	nd
1000	1224	4968
10000	918.0	2880

*表中のndは、測定時間内にオンセットODに達しなかったことを示す。

【0053】また、表1の結果に基づいて、 β -1,3-グルカナーゼ無添加の反応試液、 β -1,3-グルカナーゼ含有反応試液の夫々を使用した場合について、PGとオンセットタイムの関係を表す検量線を作成したところ、良好な検量線が得られた。これらの検量線（座標軸は両対数）に表2のデータを当てはめて、 β G標準液

の各濃度に於けるオンセットタイムに基づいて、夫々の反応試液を用いた場合の β GのPG換算値を求めた。その結果を表3に示す。

【0054】

30 【表3】

β G濃度 (ng/ml)	PG換算値 (ng/ml)	
	β -1,3-グルカナーゼ無添加	β -1,3-グルカナーゼ添加
0	—	—
0.01	0.00900	—
0.1	0.248	—
1	2.930	—
10	34.9	—
100	304	—
1000	1260	0.164
10000	11200	15.6

【0055】表3の結果から明らかなように、 β -1,3-グルカナーゼをPPO試薬に含有させた場合には、PGの測定には殆ど影響を与えず、 β GRPのproP Oカスケードを活性化させる作用を抑制することができる。言い換えれば、 β -1,3-グルカナーゼを添加することにより、PGに特異的なPPO試薬が容易に得られることが判る。

【0056】

【発明の効果】本発明は、新規なET又は／及びPG測定用試薬の処理剤、これを用いた処理方法、及び簡便なET又は／及びPG測定用試薬並びにPGの測定方法を提供するものであり、ET又は／及びPGに特異的な測定用試薬が簡便に得られる点に顕著な効果を奏するものである。